

仕 様 書

1 件名

全ゲノムシーケンス解析（ショートリード）業務委託

2 解析の目的

エクソーム解析を用いてもその原因が解明されない未診断症例に対して、エクソン以外の領域も含む全ゲノムを対象としたシーケンス解析を行い、その原因を明らかにする。

3 解析等委託項目

（別表1）のとおり

4 発注及び納品場所

神奈川県立こども医療センター臨床研究所ゲノム解析研究部門（管理棟2階組織培養実験室）

5 契約期間

契約日から令和4年3月31日まで

6 技術的要件

（別表2）のとおり

7 その他の要件

- 7-1 受注者は、3（別表1）に掲げる項目のすべてを受注可能であること。
- 7-2 受注者は、臨床検体を用いたヒトゲノムライブラリー作製が過去3年間のうち年間100件以上を有する等豊富な経験を有すること。
- 7-3 受注者は、ヒトの疾患を対象とするゲノム解析で国立研究開発法人など公的機関からの受託実績を有し、解析結果の質問に対する対応・説明することができること。
- 7-4 解析は、輸送時の供与物の品質劣化を抑えるため、日本国内で実施すること。
- 7-5 「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」第5章第12条9（海外にある者へ資料・情報を提出する場合の取扱い）に基づき、解析データは日本国内のみで保持されること。
- 7-6 本委託業務により作成された資料・データ等は、すべて発注者に帰属する。
- 7-7 本仕様書に定めのない事項及び疑義については、双方協議の上で定めるものとする。

(別表1) 解析等委託項目 (全ゲノムシーケンス解析 (ショートリード))

	解析等委託項目名	内容 データ量 / 発送単位	予定数量(件)
1	全ゲノムシーケンス解析 (ショートリード)	90~120Gb	12
2	標準データ解析 (SNV/Indel,SV,CNV)		12
3	解析報告書 (PDF、CD-R 等含む)		12
4	データ納品料 (USB3HDD に保存、納品のこと)		3
5	解析残余検体の返送	8 検体につき 1 回返送	2
6	解析サービス	解析の内容に関して協議が必要な場合は、ヒトの疾患を対象とした遺伝学やバイオインフォマティクスの知見がある解析担当者もしくは技術者が来所 (WEB 会議も可) して協議を行うこと	12
6-1	解析結果報告会議の開催		
6-2	遺伝子解析の解析サポート		
7	6 によりカスタマイズ解析に対応すること		12

※ 検体発送は発注者の負担とする。

(別表2) 全ゲノムシーケンス解析 (ショートリード) に係る技術的要件

使用機種のパフォーマンス	<p>対象とする DNA の断片化により得られた環状 1 本鎖 DNA を鋳型として、ローリングサークル型の DNA の増幅を行い、DNA ナノボールを形成させてシーケンスを行う原理によること。</p> <p>マッピング率は 99%以上を達成すること</p> <p>シーケンスサイクル数は、ペアエンド 150bp に対応可能であること。</p> <p>※解析する機器が本性能を有することを証明すること</p>
解析の種類	全ゲノムシーケンス (ライブラリー調整含む)
対象生物	ヒト
データ量	90-120Gb
リード長	150bp
ライブラリー作成	MGI Tech 社 MGI Easy PCR-Free DNA Library Prep Set または同等品
シーケンス方法	Paired-end
データ解析	<ul style="list-style-type: none"> ・ SNV/Indel 解析 ・ 構造変異解析 (CNV, SV)
解析の詳細	<p>(1) 全ゲノムシーケンス (ショートリード)</p> <p>1) 検体の品質評価</p> <p>下記項目について、提供する gDNA の品質検定を行う。</p> <p>(1-1) Qubit を用いた濃度測定</p> <p>(1-2) Nanodrop による吸光度測定</p> <p>(1-3) アガロースゲル電気泳動での DNA の分解の有無の確認</p> <p>2) シーケンスライブラリーの作製及び品質確認</p> <p>DNA の品質検定に合格したサンプルについては、以下の項目について次世代シーケンサーによるシーケンス解析のためのライブラリー調製を行う。</p> <p>(2-1) MGI Tech 社 MGIEasy PCR-Free DNA Library Prep Set もしくは同等のライブラリー調製キットを用いたライブラリー調製</p> <p>(2-2) Agilent 社バイオアナライザーまたは同等の解析機器によるライブラリーのサイズ確認</p> <p>(2-3) Qubit によるライブラリーの濃度測定</p> <p>3) シーケンシング</p> <p>(3-1) 上記仕様に沿ったシーケンシングを行う。</p> <p>(3-2) 出力生データファイルについて、必要に応じて demultiplex および各種変換を行い、配列データファイル (FASTQ ファイル) を作製する。</p> <p>(3-3) 得られたシーケンスデータについて、k-mer スペクトル、カバレッジプロット等を作成し、ゲノムの全体をカバーしたバイアスの少ない配列データが取得でき</p>

	<p>ていることを確認する</p> <p>4) マッピング・変異解析</p> <p>3) で得られた配列データについて、以下の解析を行う。</p> <p>(4-1) アダプター配列のトリミングおよび低品質リードのフィルタリングを行う。</p> <p>(4-2) 得られたクリーンリード配列について、ヒト参照ゲノム配列上へのマッピングを行い、マッピング結果を BAM ファイルに格納する。</p> <p>(4-3) 得られた BAM ファイルについて、重複リードを排除し、SNV/Indel、コピー数変異、および構造変異の検出を行う。</p> <p>(4-4) SNV/Indel の検出については、GATK4 を用いて、ヒトゲノム解析におけるベストプラクティスにしたがって解析を実施する。また、検出した SNV/Indel については、可能な限りフェージングされた結果を作成する。解析結果は、gVCF ファイルおよび VCF ファイルに保存する。また、検出した変異については、各変異が遺伝子構造に及ぼす影響、コドン・アミノ酸配列変化や遺伝子名などの各種アノテーションを付与する。さらに、検出した SNV/Indel について、COSMIC や dbSNP などのデータベースに登録がある場合は、そのアクセッション番号についても付与する。以上の解析結果を VCF ファイルおよび Excel ファイルに保存する。</p> <p>(4-5) CNV 検出の結果は、BED ファイルなどに保存する。検出した CNV については、その領域にオーバーラップする遺伝子のリストとともに Excel ファイルに保存する。</p> <p>(4-6) 構造変異については、マップされたペアエンドリードとスプリットリードを用いた解析により、欠失、逆位、タンDEM重複、転座を検出する。検出結果を VCF ファイルに保存する。また、各構造変異が遺伝子構造に及ぼす影響、タンパク質産物配列に及ぼす変化や遺伝子名などの各種アノテーションを付与する。以上の解析結果を VCF ファイルおよび Excel ファイルに保存する。</p>
納期	依頼日より 2 か月程度（解析終了次第、速やかに納品に応じること）
納品物	<p>(1) 次世代シーケンス解析結果の配列データ（FASTQ ファイル）</p> <p>(2) 次世代シーケンス解析結果の報告書（PDF ファイル）</p> <p>(3) マッピング解析結果（BAM ファイル）</p> <p>(4) SNV/Indel 解析結果（VCF ファイル、Excel ファイル）</p> <p>(5) CNV 解析結果（BED ファイル、Excel ファイル）</p> <p>(6) 構造変異解析結果（VCF ファイル、Excel ファイル）</p> <p>※ 解析データには暗号化処理又はこれと同等以上の保護措置を取り納品すること</p> <p>※ 上記はいずれも、コピーデータを納品日より 3 ヶ月間解析機関にて保管すること</p> <p>※ 保管期間後、コピーデータは確実な方法で消去し、「廃棄・消去に関する証明書」を提出すること</p>
解析残余検体の返送	受注者は、上記解析に用いた残余検体を発注者に返送する。